

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Studijní obor: Fyzikální chemie



Bc. Martin Ansorge

**Stanovení komplexačních konstant metodou částečného
plnění a analýzou průtokem způsobené disperze a jejich
srovnání s hodnotami stanovenými metodou afinitní
kapilární elektroforézy**

Determination of complexation constants by Partial Filling method and Flow Induced
Dispersion Analysis and their comparison with values determined by Affinity Capillary
Electrophoresis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Kateřina Ušelová, Ph. D.

Konzultant: RNDr. Martina Riesová, Ph. D.

Mgr. Pavel Dubský, Ph. D.

Praha 2016

Klíčová slova

komplexační konstanta, konstanta stability, kapilární elektroforéza, profen, β -cyklodextrin

Keywords

complexation constant, capillary electrophoresis, profen, β -cyclodextrin

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky RNDr. Kateřiny Ušelové, Ph.D. a školitelů konzultantů RNDr. Martiny Riesové, Ph.D. a Mgr. Pavla Dubského, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....
podpis

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Kateřině Ušelové, Ph. D. za osobitý a především trpělivý přístup při vedení mé diplomové práce. Dále děkuji svým školitelům-konzultantům RNDr. Martině Riesové, Ph. D. a Mgr. Pavlu Dubskému, Ph. D. za mnohé cenné rady a připomínky, Mgr. Magdě Ördögové a Mgr. Lídě Müllerové, Ph. D. za doplňování a formulaci mých myšlenkových pochodů, obzvláště při psaní závěrečné práce. Děkuji i zbývajícím členům ECHMET skupiny, že mi umožnili být její součástí a tvořili příjemné pracovní prostředí.

V neposlední řadě chci poděkovat své rodině za celkovou podporu při studiu na vysoké škole.

Obsah

Seznam použitých zkratk	5
Seznam použitých symbolů	6
Abstrakt	8
Abstract	9
1. Úvod a cíl práce	10
2. Teoretická část	12
2.1 Simulační programy používané v CE	12
2.2 Stanovení komplexačních konstant	14
3. Experimentální část	24
3.1 Instrumentace	24
3.2 Chemikálie	24
3.3 Příprava základních elektrolytů	25
3.4 Příprava vzorků a experimentální podmínky	25
4. Výsledky a diskuze	27
4.1 PF metoda	27
4.2 FIDA metoda	39
4.3 Diskuse	44
5. Závěr	46
Literatura	47

Seznam použitých zkratk

ACE	afinitní kapilární elektroforéza (<i>affinity capillary electrophoresis</i>)
β -CD	β -cyklodextrin
BGE	základní elektrolyt (<i>background electrolyte</i>)
CE	kapilární elektroforéza (<i>capillary electrophoresis</i>)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (<i>capillary zone electrophoresis</i>)
DMSO	dimethylsulfoxid
EOF	elektroosmotický tok (<i>electroosmotic flow</i>)
FIDA	analýza průtokem způsobené disperse (<i>flow induced dispersion analysis</i>)
IS	iontová síla (<i>ionic strength</i>)
PF	metoda částečného plnění (<i>partial filling method</i>)
PVA	polyvinylalkohol
R-Flu	(R)-(-)-2-fluoro- α -methyl-4-bifenyloctová kyselina (Flurbiprofen)
S-Ibu	(S)-(+)-4-isobutyl- α -methylfenyloctová kyselina (Ibuprofen)
S-Keto	(S)-(+)-3-benzoyl- α -methylbenzenoctová kyselina (Ketoprofen)
S-Napro	(S)-(+)-6-methoxy- α -methyl-2-naftalenoctová kyselina (Naproxen)
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
T/T	Tris-Tricinový pufr

Seznam použitých symbolů

A	plocha píku
a_i	aktivita i-té složky
D	difusní koeficient
D_A	difusní koeficient volného analytu
D_{AL}	difusní koeficient komplexu
E	intenzita elektrického pole
k_i	směrnice závislosti i-tého stanovení
K_A	aciditní disociační konstanta
K_{AL}	termodynamická komplexační konstanta komplexu
K'_{AL}	zdánlivá komplexační konstanta komplexu
l_L	délka zóny selektoru
L_{eff}	efektivní délka kapiláry (délka kapiláry k detektoru)
L_{tot}	celková délka kapiláry
μ_A	elektroforetická pohyblivost (mobilita) volného analytu
$\mu_{A,eff}$	efektivní elektroforetická pohyblivost (mobilita) analytu v přítomnosti selektoru
$\mu_{A,obs}$	pozorovaná elektroforetická pohyblivost (mobilita) analytu
μ_{AL}	elektroforetická pohyblivost (mobilita) komplexu
μ_{EOF}	elektroforetická pohyblivost (mobilita) elektroosmotického toku
μ_L	elektroforetická pohyblivost (mobilita) volného selektoru

n	látkové množství
r	poloměr kapiláry
σ^2	časový rozptyl píku
σ_A^2	časový rozptyl píku volného analytu
σ_{AL}^2	časový rozptyl píku komplexu
t_D	detekční čas
$t_{A,mig}$	migrační čas analytu
$t_{0,mig}$	migrační čas analytu v nepřítomnosti selektoru
Δt	rozdíl migračních časů
U	napětí
w	šířka píku v inflexním bodě
x	molární zlomek
X	poměr délky zóny selektoru ku efektivní délce kapiláry
x_c	střed píku
x_{in}	začátek kapiláry (<i>inlet</i>)
x_{lib}	pozice analytu v zóně selektoru v libovolném čase
x_s	pozice analytu v kapiláře v místě, kde se potká s koncem zóny selektoru
y_0	posunutí signálu od základní linie
z	nábojové číslo částice

Abstrakt

Ke stanovení komplexačních konstant modelového systému čtyř profenů (*R*-Flurbiprofen, *S*-Ibuprofen, *S*-Ketoprofen a *S*-Naproxen) komplexujících s β -cyklodextrinem byla využita metoda částečného plnění kapiláry (*Partial Filling method*, PF) a analýza průtokem způsobené disperze (*Flow Induced Dispersion Analysis*, FIDA). Při využití metody částečného plnění, při které je jen část kapiláry naplněna selektorem a analyt tak musí migrovat nejprve zónou selektoru a následně zónou čistého základního elektrolytu (v obou zónách má rozdílnou pohyblivost), je sledována změna migračního času analytu v závislosti na délce zóny selektoru. Při analýze průtokem způsobené disperze, ve které je analyt protlačován kapilárou externím tlakem, je sledována míra disperze píku v závislosti na koncentraci selektoru v kapiláře. Průběh experimentů při PF metodě byl také teoreticky vyřešen za pomoci počítačového simulačního programu Simul 5 Complex. Hodnoty komplexačních konstant získané oběma metodami byly porovnány s hodnotami získanými běžně využívanou metodou afinitní kapilární elektroforézy (ACE).

Porovnáním stanovených komplexačních konstant bylo zjištěno, že obě námi zkoumané metody poskytují srovnatelné výsledky s výsledky získanými metodou ACE.

Abstract

Partial Filling method (PF) and Flow Induced Dispersion Analysis (FIDA) were used for the determination of stability constants of model system of four profens (*R*-Flurbiprofen, *S*-Ibuprofen, *S*-Ketoprofen and *S*-Naproxen) complexing with β -cyclodextrin. When using PF method, only a part of capillary is filled with the selector and thus the analyte must migrate through the zone of selector first and then through the neat BGE (it has different mobilities in both zones). Dependency of the differences in migration time on the length of the selector zone is then studied. When FIDA is used, the analyte is pushed through the capillary by external pressure and dependency of the rate of peak dispersion of the analyte on the concentration of selector in capillary is observed. Moreover, PF experiments were theoretically studied by Simul 5 Complex computing programme. Values of stability constants obtained by both methods were compared with values obtained by frequently used Affinity Capillary electrophoresis (ACE) method.

The comparison of stability constants values determined by PF method and FIDA shows that both investigated methods grants results comparable with those obtained by the ACE.

1. Úvod a cíl práce

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je rozšířenou elektrochemickou separační metodou umožňující separaci velkého množství látek. CZE lze využít i ke stanovení fyzikálně-chemických charakteristik látek¹, jejichž hodnoty jsou nezbytná vstupní data počítačových programů simulujících elektroforetický proces. Počítačové simulační programy pak lze s výhodou využít k optimalizaci separačních podmínek, což významně snižuje časovou a finanční náročnost následně prováděných experimentů.

Pracovní skupina, ve které předkládaná diplomová práce vznikla, se mimo jiné zabývá právě tvorbou počítačových programů simulujících elektroforetický proces komplexujících látek (PeakMaster5.3^{2,3} a Simul 5 Complex⁴). Nezbytnou součástí vývoje takových programů je i experimentální ověřování výsledků simulací, či stanovování fyzikálně-chemických parametrů využívaných při simulacích separací.

Ke stanovení komplexačních konstant může být využita některá z metod kapilární zónové elektroforézy. Přehled užívaných metod sloužících ke stanovení komplexačních konstant lze najít v přehledových článcích⁵⁻⁷. Nejvíce rozšířenou metodou je afinitní kapilární elektroforéza (ACE), která ke stanovení využívá odlišné pohyblivosti volné a komplexované formy analytu. Efektivní pohyblivost analytu je pak funkcí síly jeho komplexace s přítomným selektorem a koncentrace tohoto selektoru. Alternativními metodami prováděnými v kapiláře, které mohou být využity ke stanovení komplexačních konstant a které byly vybrány ke vzájemnému porovnání jejich použitelnosti a spolehlivosti v rámci této práce, jsou analýza průtokem způsobené disperze (*Flow Induced Dispersion Analysis*; FIDA)⁸ a metoda částečného plnění (*Partial Filling*; PF)⁹.

Cílem předkládané diplomové práce je

- stanovení komplexačních konstant vybraných slabých elektrolytů metodou FIDA,
- stanovení komplexačních konstant vybraných slabých elektrolytů metodou PF,
- porovnání stanovených komplexačních konstant s hodnotami získanými metodou ACE,
- zhodnocení výhod a nevýhod metod FIDA a PF.

2. Teoretická část

2.1 Simulační programy používané v CE

Jednou z nesporných výhod kapilární elektroforézy je existence jejího uceleného matematického popisu. S příchodem komerčně dostupných počítačů se matematický popis elektroforetického procesu začal implementovat do počítačových simulačních programů. První dynamické počítačové modely vznikaly v 70. a 80. letech minulého století v USA, Švýcarsku a tehdejším Československu. Takové počítačové modely popisovaly elektroforetické chování silných a slabých elektrolytů. Současně se zvyšující se výkonností výpočetních zařízení vznikaly i dokonalejší modely elektroforetického procesu. V roce 1991 byl publikován model¹⁰ zahrnující kromě elektromigrace a difúze analytu i vliv EOF na průběh separace. Ucelený přehled chronologického vývoje simulačních elektroforetických programů je uveden v přehledových člancích Thormanna a kol.^{11,12}

V současné době si nelze chod chemické laboratoře bez počítačového vybavení představit a tak se i simulace elektroforetických experimentů stávají běžnou laboratorní praxí. Hlavními výhodami dynamických simulací jsou i) možnost teoretického určení vhodných experimentálních podmínek bez nutnosti provedení řady experimentů, ii) vhled do dějů pobíhajících v kapiláře a jejich hlubší pochopení v důsledku možnosti snadné změny experimentálních podmínek a iii) jejich použití pro edukativní účely.

Simulační modely elektroforetického procesu využívají po chemické stránce princip elektroneutality a zákony o zachování hmoty a náboje. Pracují se soustavou rovnic popisujících acidobazické rovnováhy v roztocích slabých elektrolytů a s rovnicemi kontinuity. Rovnice kontinuity jsou nelineární parciální diferenciální rovnice obecně popisující distribuci veličin (např. hmoty, elektrického náboje) v čase a prostoru¹³. Soustava takových rovnic nemá analytické řešení, ale je možné ji řešit numericky, například pomocí dynamických simulací.

V dnešní době patří mezi nejpoužívanější elektroforetické simulační programy SPRESSO^{14,15}, GENTRANS¹⁶⁻¹⁸ a Simul 5¹⁹.

Program **SPRESSO** (volně dostupný na <http://microfluidics.stanford.edu/download>) je nejnovějším z trojice uvedených a kromě rovnic kontinuity a rovnic popisujících příslušné protolytické rovnováhy, obsahuje také modely pro tlakem řízený průtok a Taylorovu-Arisovu disperzi²⁰. K řešení příslušných rovnic, na rozdíl od zbývajících dvou programů, používá tzv. adaptivní mřížku¹⁵, která umožňuje „nahuštění“ simulačních bodů v místech, ve kterých dochází k výrazným změnám sledované veličiny. Program umožňuje přímé sledování průběhu simulací a poskytuje možnost zahrnutí vlivu iontové síly na elektroforetickou pohyblivost částic do výpočtů.

Program **GENTRANS** ve svém kódu obsahuje sedm různých oddělených modelů pro různé typy jednovazných a vícevazných látek. Použití těchto oddělených modelů v jednoduchých případech značně zkrátí dobu simulace. GENTRANS také poskytuje možnost tzv. „vyhlazování“ dat, čímž lze předejít vzniku numerických oscilací. Nicméně, GENTRANS neumožňuje zahrnutí vlivu iontové síly na elektroforetickou pohyblivost částic, ani velmi cenné přímé sledování vlastního průběhu simulace.

Simulační program **Simul 5**, obdobně jako program SPRESSO, řeší rovnice kontinuity a rovnice popisující protolytické rovnováhy. K řešení soustavy těchto rovnic však nevyužívá adaptivní mřížku, ale uniformní (konstantní) mřížku, která udržuje konstantní vzdálenost simulačních bodů. K urychlení simulací program používá tzv. pohyblivé hranice, které vymezují výpočetní prostor, ve kterém se předpokládají změny koncentrací. Simul 5 nabízí možnost přímého sledování průběhu simulací a uživatelské rozhraní umožňující snadné a přehledné zadávání vstupních parametrů.

Porovnání zmíněných programů bylo na řadě simulovaných experimentů provedeno Mosherem²². Z jeho srovnání vychází, že pro simulace systémů s velkým množstvím jednovazných látek při vysoké proudové hustotě je nejvýhodnější použít program GENTRANS. Pro systémy s malým množstvím komponentů je výhodné naopak použít program Simul 5, který poskytuje vizuální kontrolu probíhající simulace a možnost

rychle a snadno měnit simulační parametry. Program SPRESSO je vhodný pro rychlé simulace v krátkých kapilárách.

Simul 5 Complex pracuje na stejném principu a se stejnými rovnicemi jako Simul 5, navíc ale do výpočtů zařazuje i rovnice popisující nejjednodušší komplexační rovnováhy. Do výpočtu zahrnuje komplexační konstanty a elektroforetické pohyblivosti všech forem analytu i selektoru. Simul 5 Complex je vhodným nástrojem pro simulování elektroforetických experimentů různých módů CE. Porovnání výstupů tohoto programu s reálnými experimenty lze nalézt v publikacích^{23,24}.

Oba počítačové simulační programy Simul 5 i Simul 5 Complex byly vyvinuty v naší laboratoři²⁵ a jsou volně dostupné na adrese <http://natur.cuni.cz/gas>.

Stejně jako program Simul 5 Complex, i GENTRANS obsahuje zabudované rovnice pro komplexační rovnováhy²⁶. Na rozdíl od prvně jmenovaného ale není běžně dostupný.

Pro simulace komplexujících systémů, stejně jako pro simulace a optimalizace chirálních separací, je však nezbytná znalost hodnot komplexačních konstant daných systémů. Rozdíly v hodnotách komplexačních konstant jednotlivých enantiomerů s danými selektory se projeví rozdílnými hodnotami efektivních elektroforetických mobility a v důsledku i v rozdílných migračních časech jednotlivých enantiomerů.

2.2 Stanovení komplexačních konstant

Komplexační konstanta (konstanta stability) popisuje sílu interakce mezi analytem A a komplexačním činidlem (selektorem, ligandem) L. V nejjednodušším případě, kdy analyt a selektor interagují v poměru 1:1 za vzniku komplexu AL, lze komplexační rovnováhu popsat rovnicí



a tuto interakci při dané teplotě charakterizovat termodynamickou komplexační konstantou K_{AL}

$$K_{AL} = \frac{a_{AL}}{a_A a_L}, \quad (2)$$

kde symboly a_{AL} , a_A a a_L značí aktivitu jednotlivých složek rovnováhy (1). Pro zředěné roztoky lze aktivity v rovnici (2) nahradit koncentracemi a zavést tak zdánlivou komplexační konstantu K'_{AL} , kde $[]$ symbolizují rovnovážné molární koncentrace příslušných složek

$$K'_{AL} = \frac{[AL]}{[A][L]}. \quad (3)$$

Hodnota K'_{AL} závisí na příslušných experimentálních podmínkách (teplotě, iontové síle základního elektrolytu, viskozitě) a její jednotkou je $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$.

Znalosti komplexačních konstant lze s výhodou využít při počítačové optimalizaci elektroforetického procesu a to například i při separaci optických izomerů daného analytu. Při použití vhodného chirálního selektoru poskytují jednotlivé enantiomery interakce o rozdílné síle a tento rozdíl se projeví v odlišných hodnotách efektivní elektroforetické pohyblivosti enantiomerů.

2.2.1 Afinitní kapilární elektroforéza

Přednost ACE spočívá především v nízké spotřebě analytů i komplexačního činidla, a v jednoduchém experimentálním uspořádání. Při ACE je kapilára naplněna základním elektrolytem, který obsahuje selektor L o určité koncentraci. Poté je do kapiláry nadávkováno malé množství analytu A. Po ustanovení rovnováhy mezi A a L (1) je efektivní pohyblivost analytu $\mu_{A,\text{eff}}$ určována hodnotou komplexační konstanty a hodnotami elektroforetických pohyblivostí volného analytu μ_A a komplexu μ_{AL} . Zdánlivou komplexační konstantu K_{AL} je tedy možné stanovit ze závislosti $\mu_{A,\text{eff}}$ na L podle rovnice

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{\mu_A + \mu_{AL} K'_{AL} L}{1 + K'_{AL} L}. \quad (4)$$

Molární koncentraci volného selektoru L je v případě velkého přebytku selektoru oproti analytu zpravidla možné pro výpočty nahradit analytickou koncentrací selektoru.

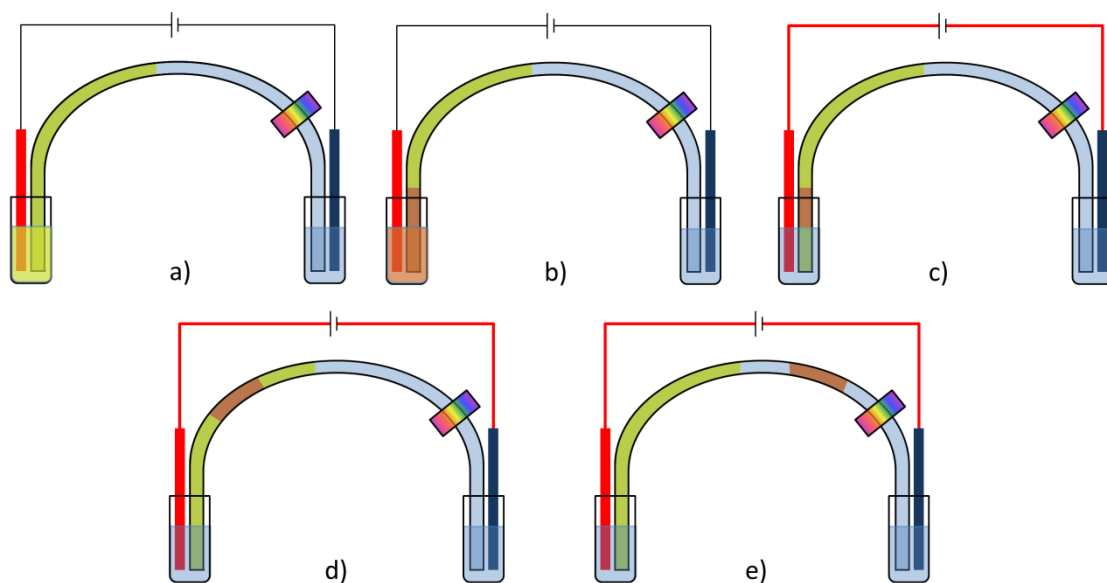
Rovnici (4), poprvé prezentovanou Rawjeem a Vighem²⁷, lze však použít jen v případě, kdy ke změně efektivní elektroforetické pohyblivosti analytu dochází pouze v důsledku komplexace. Jak bylo ale v naší skupině ukázáno²⁸, v praxi tato pohyblivost bývá ovlivněna i dalšími faktory (např. teplotou, iontovou silou základního elektrolytu nebo jeho viskozitou), a tak je třeba stanovenou hodnotu zdánlivé komplexační konstanty dále vhodně korigovat²⁸⁻³³.

2.2.2 Metoda částečného plnění

Metoda částečného plnění (*Partial Filling*, PF) je považována za mód afinitní kapilární elektroforézy. Poprvé byla jako metoda sloužící k separaci enantiomerů představena Valtchevou et al.⁹ a optimalizována Tanakou a Terabem³⁴. Jako metoda využitelná ke stanovení komplexačních konstant byla prvně představena Aminim a Westerlundem³⁵.

Stejně jako v experimentálním uspořádání ACE, je i při použití metody částečného plnění selektor přítomen v základním elektrolytu. Směsí BGE a selektoru je však naplněna jen část kapiláry, zatímco zbytek kapiláry je naplněn čistým BGE. Po nadávkování vzorku a vložení napětí musí analyt nejprve promigrovat zónou selektoru a poté čistým BGE. Schematické znázornění experimentálního uspořádání PF experimentu je zobrazeno na Obr. 1.

Hlavní výhoda PF metody jako celku spočívá v možnosti stanovování komplexačních konstant systémů, ve kterých je použit selektor silně absorbující v UV/Vis oblasti. S tím je spojena i výhodnost užití PF metody v případě využití CE spojené s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie^{36,37}, ta se však projeví spíše při separaci analytů.



Obr. 1: Schematické znázornění PF experimentu; a) dávkování zóny selektoru, b) dávkování analytu, c) vložení napětí, d) migrace analytu zónou selektoru, e) migrace analytu v BGE. Modře je znázorněn BGE, žlutě selektor a oranžově analyt. Pro ilustraci použit neutrální selektor, experiment bez vlivu EOF.

Stanovovat komplexační konstanty PF metodou lze zpravidla dvěma způsoby. V prvním z nich se zachovává konstantní koncentrace selektoru a mění se délka jeho zóny v kapiláře. Ve druhém je zachována konstantní délka zóny selektoru, zatímco koncentrace selektoru je proměnná. Úspěšné stanovení komplexačních konstant oběma způsoby bylo publikováno v řadě prací^{35,38-43}.

Metoda částečného plnění I. (dle Aminiho a Westerlunda)

Pro využití metody částečného plnění ke stanovení zdánlivé komplexační konstanty je možné v literatuře nalézt dva přístupy. Prvním z nich je přístup prezentovaný Aminim a Westerlundem³⁵, který ke komplexaci využívá neutrální selektor (případně nabitý selektor, který má v kapiláře opačný směr migrace než daný analyt). Komplexační konstantu lze stanovit ze závislosti změny pozorované mobility analytu $\mu_{A,obs}$ na délce zóny selektoru o konstantní koncentraci. Vzhledem k faktu, že analyt musí promigrovat přes zónu selektoru a následně přes čistý základní elektrolyt, lze předpokládat, že $\mu_{A,obs}$ bude dána váženým průměrem pohyblivosti analytu uvnitř a vně zóny selektoru

$$\mu_{A,obs} = \mu_{A,eff}X + \mu_A (1 - X) + \mu_{EOF}, \quad (5)$$

kde X je poměr délky zóny selektoru l_L a efektivní délky kapiláry L_{eff}

$$X = \frac{l_L}{L_{eff}}. \quad (6)$$

Kombinací rovnic (4) a (5) lze získat lineární závislost výrazu $\mu_{A,obs} - \mu_A (1 - X)$ na X

$$\mu_{A,obs} - \mu_A (1 - X) - \mu_{EOF} = \frac{\mu_A + \mu_{AL}K'_{AL} \frac{L}{L}}{1 + K'_{AL} \frac{L}{L}} X, \quad (7)$$

kde výraz $\frac{\mu_A + \mu_{AL}K'_{AL} \frac{L}{L}}{1 + K'_{AL} \frac{L}{L}}$ je směrnici této přímky. Z hodnoty směrnice je možné při znalosti μ_{AL} vypočítat hodnotu komplexační konstanty K'_{AL} . V případě, že hodnota μ_{AL} není známa, lze provést sérii PF experimentů při dvou různých koncentracích selektoru a pohyblivost komplexu stanovit podle vztahu

$$\mu_{AL} = \frac{L_1 k_1 \mu_A - k_2 - L_2 k_2 \mu_A - k_1}{L_1 \mu_A - k_2 - L_2 \mu_A - k_1}, \quad (8)$$

kde L_i značí molární koncentraci použitého selektoru při jednotlivých měření a k_i jsou směrnice příslušných lineárních závislostí podle rovnice (7).

Tímto způsobem získáme zdánlivou hodnotu komplexační konstanty. Pro získání termodynamické hodnoty je třeba pozorovanou pohyblivost korigovat s ohledem na všechny faktory, které stanovení ovlivňují (iontovou sílu, viskozitu prostředí, teplotu).

Tento přístup je vhodné využívat stanovování komplexačních konstant slabě interagujících systémů ($K'_{AL} < 100 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$), a to z důvodu linearit vynášené závislosti (na rozdíl od hyperbolické závislosti užívané v metodě ACE) a jejím přesnějším proložení.

Metoda částečného plnění II. (dle Nilssona)

Druhý přístup stanovení komplexační konstanty metodou částečného plnění zavedl Nilsson³⁹, který ke komplexaci použil selektor nabitý opačně než analyt. Komplexační konstantu lze v tomto případě stanovit ze závislosti migračního času analytu na množství selektoru v kapiláře. Lze předpokládat, že analyt migrující zónou selektoru bude zpomalen oproti analytu migrujícímu v čistém BGE v důsledku interakce analyt-selektor. Výsledný rozdíl mezi migračním časem analytu v kapiláře bez selektoru a v kapiláře obsahující zónu selektoru bude závislý nejen na délce této zóny, ale také na koncentraci selektoru v této zóně. Kompletní odvození vztahu pro výpočet komplexační konstanty podle Nilssona je uvedeno v publikaci³⁹ a vychází z nejjednoduššího případu, použití neutrálního selektoru. V takovém případě je rozdíl migračních časů analytu v přítomnosti a bez přítomnosti selektoru Δt dán výrazem

$$\Delta t = t_{A,mig} - t_{0,mig} \quad (9a)$$

$$\Delta t = t_{v \text{ zóny}} + t_{mimo \text{ zónu}} - t_{0,mig} \quad (9b)$$

$$\Delta t = \frac{XL_{eff}}{E\mu_{A,eff}} + \frac{1-X}{E\mu_A} L_{eff} - \frac{L_{eff}}{E\mu_A} \quad (9c)$$

$$\Delta t = t_{A,mig} - t_{0,mig} = \frac{XL_{eff}}{E} \frac{1}{\mu_A + \mu_{AL} - \mu_A \frac{L}{L + \frac{1}{K'_{AL}}}} - \frac{1}{\mu_A}, \quad (9d)$$

kde $t_{0,mig}$ je migrační čas analytu v základním elektrolytu bez přítomnosti selektoru a E intenzitu elektrického pole. V případě použití nabitého selektoru, je však třeba rovnici (9d) dále upravit, neboť nabitý selektor vykazuje v daném BGE svou vlastní elektroforetickou pohyblivost. Z tohoto důvodu se délka zóny selektoru v kapiláře s časem mění. Efektivní délku zóny selektoru je možné vyjádřit jako pozici v kapiláře od dávkovací strany kapiláry, x_s , ve které se analyt potká s koncem zóny selektoru (Obr. 2)

$$x_s = E \mu_{A,eff} - \mu_L t = XL_{eff}, \quad (10)$$

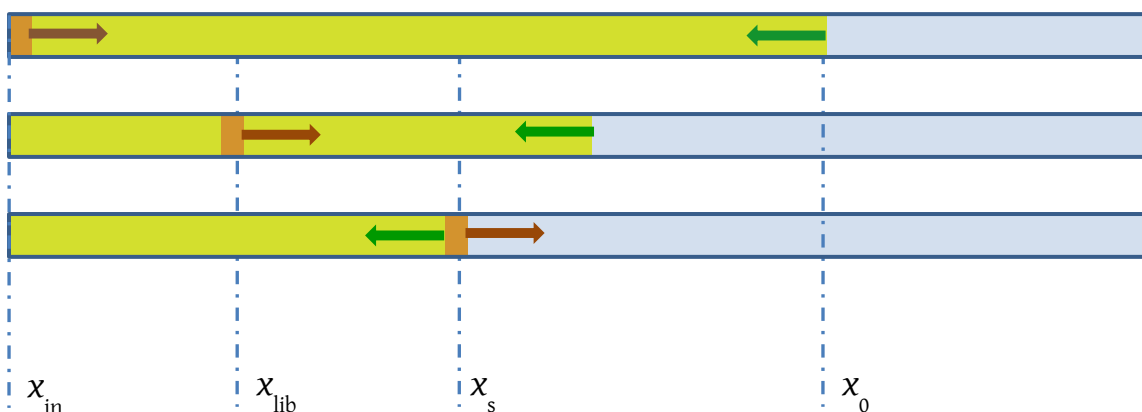
kde symbol μ_L označuje elektroforetickou pohyblivost volného selektoru. Obecně lze pozici analytu v zóně selektoru v libovolném čase x_{lib} zjistit pomocí vztahu

$$x_{lib} = E \mu_{A,eff} t, \quad (11)$$

který lze dále upravit využitím rovnic (10) a (4) na tvar

$$x_{lib} = \frac{X L_{eff} \mu_A + \mu_{AL} - \mu_A \frac{L}{L + \frac{1}{K'_{AL}}}}{\mu_A + \mu_{AL} - \mu_A \frac{L}{L + \frac{1}{K'_{AL}}} - \mu_L}. \quad (12)$$

Symbol x_{lib} představuje pozici analytu v kapiláře, kde analyt opouští zónu selektoru, a tedy platí $x_{lib} = x_s$



Obr. 2: Jednotlivé pozice analytu a selektoru v kapiláře. Symbol x_{in} označuje začátek kapiláry (inlet), x_0 značí konec zóny selektoru v čase $t=0$, x_s značí místo, kde se analyt potká s koncem zóny selektoru a představuje tak efektivní délku zóny selektoru a x_{lib} označuje pozici analytu v zóně selektoru v libovolném čase. Šipky znázorňují směr putování: hnědá – analytu, zelená – selektoru.

Zavedením předpokladu, že pohyblivost komplexu analytu (většinou nízkomolekulární látky) se selektorem (velké molekuly cyklodextrinů, antibiotik apod.) je jen nepatrně odlišná od pohyblivosti volného selektoru, tj. pohyblivost volného analytu je podstatně větší než rozdíl pohyblivostí komplexu a volného selektoru

$$\mu_{AL} - \mu_L \ll \mu_A, \quad (13)$$

lze μ_L zaměnit za μ_{AL} a vztah (12) zjednodušit na tvar

$$x_{\text{lib}} = XL_{\text{eff}} K'_{\text{AL}} L \frac{\mu_{\text{AL}}}{\mu_{\text{A}} - \mu_{\text{AL}}} + \frac{\mu_{\text{A}}}{\mu_{\text{A}} - \mu_{\text{AL}}} . \quad (14)$$

Sjednocením výrazů (14) a (9d) dostaneme po úpravě výraz

$$\Delta t = \frac{XL_{\text{eff}} L K'_{\text{AL}}}{E\mu_{\text{A}}} . \quad (15)$$

Podrobnější odvození je uvedeno v článku³⁹. Rovnici (15) lze dále upravit na tvar

$$\Delta t = \frac{nt_{0,\text{mig}}K'_{\text{AL}}}{\pi r^2 L_{\text{eff}}} , \quad (16)$$

kde n je celkové látkové množství selektoru v kapiláře a r vnitřní poloměr kapiláry. Komplexační konstantu lze pak získat ze závislosti změny migračního času na celkovém látkovém množství selektoru v kapiláře

$$K'_{\text{AL}} = \frac{\pi r^2 L_{\text{eff}}}{t_{0,\text{mig}}} \frac{d\Delta t}{dn} . \quad (17)$$

Ze vztahu (17) je patrné, že ke stanovení komplexační konstanty K_{AL} uvedeným způsobem je třeba znát pouze vnitřní průměr kapiláry, celkové látkové množství selektoru nadávkovaného do kapiláry a migrační čas volného analytu bez přítomnosti selektoru v kapiláře. Tento způsob stanovení nezávisí na pohyblivosti volného ani komplexovaného analytu a distribuci selektoru v kapiláře a také není ovlivněn elektroosmotickým tokem, je-li jeho hodnota v průběhu experimentů konstantní.

2.2.3 Analýza průtokem způsobené disperze

Ke stanovení komplexačních konstant lze použít i metody, které využívají aparaturu pro CE, např. analýzu průtokem způsobené disperze (*Flow Induced Dispersion Analysis*, FIDA)⁸. Metoda FIDA byla prvně představena Jensenem a Østergaardem⁸ a je založena na Taylorově dispersní analýze^{20,21,44}. K jejím experimentálnímu provedení je v principu potřeba pouze úzká trubice (kapilára) a detektor. Proto lze s výhodou použít aparaturu pro CE. Zóna analytu je nadávkována do kapiláry naplněné BGE obsahujícím selektor

v různých koncentracích a poté je hydrodynamicky protlačována k detektoru. Při této metodě se sledují změny tvaru píku analytu způsobené difusí v závislosti na koncentraci selektoru obsaženém v základním elektrolytu.

Po nadávkování analytu do kapiláry a aplikaci externího tlaku dochází k disperzi píku analytu. Ta je způsobena konvekcí rovnoběžnou se směrem toku a radiální difusí. Důsledkem difuze nabývá pík nadávkovaného analytu gaussovského tvaru⁴⁵, pro který lze stanovit jeho časový rozptyl σ^2 . Podle Taylorovy-Arisovy teorie^{20,21} souvisí časový rozptyl píku σ^2 s difuzivitou analytu²⁰ a (při splnění Taylorovy podmínky⁴⁶ pro tlakem řízený tok v kapiláře,

$$D \ll r^2 u^2 / 48 D, \quad (18)$$

kde u značí střední rychlost toku kapaliny v kapiláře, je nepřímo úměrný difusnímu koeficientu D (cit. 45) podle vztahu

$$D = \frac{r^2}{24 \sigma^2} t_D, \quad (19)$$

ve kterém je t_D čas, při kterém analyt prochází detektorem (pro zjednodušení bude v této práci nazýván detekčním časem).

Princip metody vychází z rozdílné difuzivity velkých a malých částic (větší molekuly difundují pomaleji než malé). V případě, že interaguje malý analyt s velkým selektorem, dojde vlivem komplexace ke změně difusního koeficientu analytu. Je-li analyt podstatně menší než komplexační činidlo, lze předpokládat, že difusní koeficient komplexu bude shodný s difusním koeficientem volného selektoru. Pozorovaná difuzivita analytu je závislá na množství volného analytu a komplexu, tedy na koncentraci selektoru v BGE a hodnotě příslušné komplexační konstanty.

Při přítomnosti selektoru v BGE bude pozorovaná difuzivita analytu dána poměrem koncentrací volného analytu a komplexu. Za předpokladu, že je proces komplexace podstatně rychlejší než rychlost pohybu analytu směrem k detektoru, je pozorovaný difusní koeficient analytu $D_{A,obs}$ váženým průměrem difusního koeficientu volného analytu D_A a komplexu D_{AL}

$$D_{A,obs} = D_A x + D_{AL} (1 - x) , \quad (20)$$

kde x značí molární zlomek daný výrazem

$$x = \frac{A}{A + AL} . \quad (21)$$

Při splnění Taylorovy podmínky (18) a za předpokladu, že analyt ani komplex nejsou v kapiláře jakkoli zadržovány (například interakcemi se stěnou kapiláry), budou detekční časy analytu i komplexu stejné a výraz (20) je možné vyjádřit pomocí časových rozptylů píků σ^2

$$\frac{t_D}{\sigma^2} = \frac{t_D}{\sigma_A^2} x + \frac{t_D}{\sigma_{AL}^2} (1 - x) , \quad (22)$$

kde σ_A^2 je pozorovaný časový rozptyl píku volného analytu a σ_{AL}^2 je pozorovaný časový rozptyl píku komplexu.

Dosazením výrazu (21) do rovnice (3) dostáváme pro molární zlomek rovnost

$$x = \frac{1}{1 + K'_{AL} L} . \quad (23)$$

Kombinací rovnic (22) a (23) pak lze získat rovnici vazebné izotermy ve tvaru

$$\frac{t_D}{\sigma^2} = \frac{\frac{t_D}{\sigma_A^2} + \frac{t_D}{\sigma_{AL}^2} K'_{AL} L}{1 + K'_{AL} L} . \quad (24)$$

Obdobně jako u metody ACE, lze hodnotu zdánlivé komplexační konstanty určit ze závislosti poměru detekčního času ku časovému rozptylu píku na koncentraci selektoru v základním elektrolytu.

3. Experimentální část

3.1 Instrumentace

Experimenty byly prováděny na přístroji pro kapilární elektroforézu Agilent^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s UV/Vis spektrometrickým detektorem s diodovým polem (DAD). Aparatura byla řízena softwarem Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Pro FIDA experimenty byla použita křemenná kapilára (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) o vnitřním průměru 50 µm a o celkové délce 491 mm (406 mm k DAD). Pro PF experimenty byla použita křemenná kapilára s vnitřním pokrytím polyvinylalkoholem (PVA) (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) o vnitřním průměru 50 µm a o celkové délce 645 mm (560 mm k DAD).

Měření pH BGE bylo provedeno pH-metrem PHM 220 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Radiometer, Kodaň, Dánsko). Ke kalibraci pH metru byly použity standardní IUPAC pufrů o hodnotě pH 7,000 a 10,012 (Radiometer analyticals SAS, Lyon, Francie).

Simulace PF experimentů byly prováděny v programu Simul 5 Complex⁴, složení pufrů bylo vypočteno v programu PeakMaster 5.3^{2,3}. Pro vyhodnocení experimentálních dat byly využity programy MS Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) a Origin Pro v8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

3.2 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly dodané společností Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). K přípravě základních elektrolytů byl použit 2-amino-2-hydroxyethyl-propan-1,3-diol (Tris; ≥ 99,9%) a N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin (Tricin; ≥ 99,5%). Jako selektor sloužil β-cyklodextrin (β-CD; ≥ 98%). K určování rychlosti elektroosmotického toku byl použit dimethylsulfoxid (DMSO; 99,9%). Jako analyty sloužily čtyři profeny, konkrétně (*R*)-(-)-2-fluoro-α-methyl-4--bifenyl-octová kyselina (*R*-Flurbiprofen, *R*-Flu; 97%), (*S*)-(+)-4-isobutyl-α-methylfenyl-octová kyselina (*S*-Ibuprofen, *S*-Ibu; 99%), (*S*)-(+)-3-benzoyl-α-methylbenzeno-octová kyselina

(S-Ketoprofen, S-Keto; 99%) a (S)-(+)-6-methoxy- α -naftalenoctová kyselina (S-Naproxen, S-Napro; 98%). K přípravě roztoků byla použita deionizovaná voda (Wartex Rowapur + Ultrapur, Praha, Česká republika).

3.3 Příprava základních elektrolytů

Jako základní elektrolyt byl zvolen Tris-Tricinový (T/T) pufr o experimentální hodnotě pH 8,56 a iontové síle 10 mmol dm⁻³. Koncentrace obou složek BGE byla 20 mmol dm⁻³. Roztoky základního elektrolytu se selektorem o koncentracích 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 a 8 mmol dm⁻³ byly připraveny z 10mmol dm⁻³ zásobního roztoku β -CD v T/T pufru ředěním T/T pufr. Pro PF metodu byl jako základní elektrolyt použit 20mmol dm⁻³ T/T pufr s přídavkem 0,05% (w/w) PVA z důvodu udržení konstantní hodnoty elektroosmotického toku během měření.

Roztok základního elektrolytu i roztok elektrolytu se selektorem byly před použitím přefiltrovány pomocí Minisart filtrů s velikostí pórů 45 μ m (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Německo).

3.4 Příprava vzorků a experimentální podmínky

Vzorky pro **FIDA experimenty** byly připraveny smíšením zásobních roztoků profenů o koncentraci 1,5 mmol dm⁻³ v 20mmol dm⁻³ T/T pufru se zásobním roztokem 10mmol dm⁻³ β -CD a následně doplněny T/T pufr. tak, aby výsledná koncentrace selektoru odpovídala příslušným koncentracím selektoru v BGE. Výsledná koncentrace analytů v jednotlivých vzorcích byla 0,6 mmol dm⁻³.

Analyty byly do kapiláry dávkovány tlakem 30 mbar po dobu 10 s (délka zóny analytu byla menší než 1 % celkové délky kapiláry) a následně protlačovány kapilárou k detektoru externím tlakem 50 mbar. Každý experiment byl opakován čtyřikrát.

Vzorky pro **PF experimenty** byly připraveny rozpuštěním analytů v 20mmol dm⁻³ T/T pufru s přídavkem 0,05% PVA (w/w). Jako marker elektroosmotického toku byl použit 0,004% DMSO (V/V). Koncentrace zásobních roztoků analytů byla 1,5 mmol dm⁻³. V dávkovaných vzorcích byly analyty o koncentraci 0,03 mmol dm⁻³. Roztok selektoru

byl připraven zředěním 10 mmol dm^{-3} zásobního roztoku β -CD v základním elektrolytu na výslednou koncentraci 3 mmol dm^{-3} .

Analyty byly dávkovány externím tlakem 20 mbar po dobu 5 s (asi 0,2 % celkové délky kapiláry). Zóny selektoru byly dávkovány externím tlakem o hodnotě 50 mbar. Dávkovací časy selektoru a příslušné délky zón selektoru jsou uvedeny v Tabulce 1.

PF experimenty byly prováděny za konstantního napětí -25 kV a teploty 25 °C. Absolutní hodnota procházejícího proudu nepřevyšovala $4,5 \mu\text{A}$.

Tabulka 1: Parametry zóny selektoru při metodě PF. $t_{\text{dávkování}}$ udává dobu dávkování selektoru v sekundách a X v % udává poměr délky zóny selektoru ku efektivní délce kapiláry podle rovnice (6).

$t_{\text{dávkování}} / \text{s}$	$X / \%$
76	9
221	26
341	40
426	50
852	100

4. Výsledky a diskuze

4.1 PF metoda

4.1.1 Simulace

Použití metody částečného plnění pro stanovení komplexačních konstant je limitováno nejen požadavky kladenými na experimentální systém, ale i zjednodušeními výpočetních postupů s ohledem na oba použité přístupy (dle Aminiho a Westerlunda a dle Nilssona, viz kapitola 2.2.2). Cílem prováděných simulací bylo získání informací o průběhu elektromigračního procesu a vlivu experimentálního uspořádání na výsledek elektromigrace a tím na stanovení komplexační konstanty sledovaného systému. Na základě publikovaných prací^{38,39} byla počítačovými simulacemi ověřována platnost splnění požadovaných podmínek a použitelnost uvedených postupů vyhodnocení experimentálních dat pro zvolené systémy.

Simulace byly prováděny v programu Simul 5 Complex a to s rozdílnými vstupními parametry pro oba zmiňované přístupy při využití metody PF. V obou případech byla při simulacích experimentů měněna délka zóny selektoru.

Simulace PF dle Aminiho a Westerlunda s neutrálním selektorem

Vstupní parametry simulací jsou uvedeny v Tabulce 2. Při simulacích byla kapilára rozdělena na tři části, přičemž BGE byl přítomen v celé délce kapiláry. První část kapiláry tvořila 0,5 % její celkové délky a obsahovala kromě BGE i analyt. Druhá část kapiláry měla proměnnou délku a obsahovala kromě BGE i selektor. Proměnným vstupním parametrem simulací byla také hodnota příslušné komplexační konstanty. Hodnoty komplexačních konstant použitých pro simulace byly 110, 218, 550, 1000 a 5012 dm³ mol⁻¹. Nízká hodnota komplexační konstanty, 110 dm³ mol⁻¹, byla přejata z článku publikovaného Aminim³⁸. Středně vysoká hodnota komplexační konstanty, 550 dm³ mol⁻¹, byla zvolena pro svou podobnost s komplexačními konstantami systémů *S*-Keto a *S*-Napro s β-CD²⁹. Vysoká hodnota komplexační konstanty, 5012 dm³ mol⁻¹, se blíží hodnotám komplexačních konstant systémů *R*-Flu a *S*-Ibu

s β -CD²⁹. Hodnoty konstant $1000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ a $218 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ vhodně doplňují soubor simulovaných experimentů. Použité délky zón selektoru jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 2: Parametry simulací metody PF s neutrálním selektorem (přístup dle Aminiho a Westerlunda³⁸). Hranaté závorky označují analytickou koncentraci, z označuje nábojové číslo iontu.

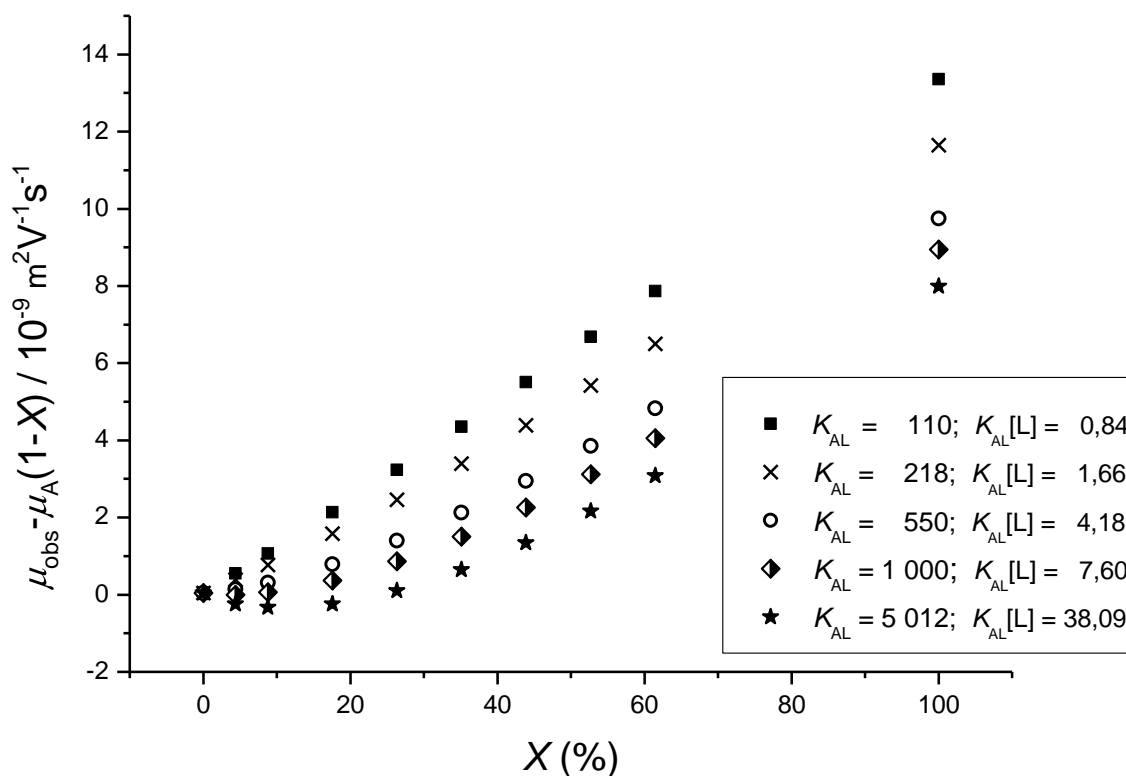
Simulace	mřížkové body	3000	Analyt	pK_a	9,3
	šířka píku / m	2×10^{-5}		z	+1
Kapilára	L_{tot} / m	$4,95 \times 10^{-2}$	Selektor	$\mu_A / \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	$18,1 \times 10^{-9}$
	L_{eff} / m	$4,4 \times 10^{-2}$		$[A] / \text{mmol dm}^{-3}$	$4,7 \times 10^{-2}$
	r / m	$2,5 \times 10^{-5}$		pK_a	12
Systém	U / V	200	Komplex	z	0
	pH ¹	3,05		$\mu_L / \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	5×10^{-9}
	t / °C	25		$[L] / \text{mmol dm}^{-3}$	7,6
BGE	$[\text{H}_3\text{PO}_4] / \text{mmol dm}^{-3}$	45		$K_{\text{AL}} / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$	proměnná
	$[\text{NaOH}] / \text{mmol dm}^{-3}$	39		pK_{AL}	proměnná
				$\mu_{\text{AL}} / \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	$7,7 \times 10^{-9}$

¹ Korekce pH na iontovou sílu nebyla provedena.

Tabulka 3: Délky zón selektoru l_L a procentuální poměr délek zón selektoru ku efektivní délce kapiláry X použitých při simulacích PF experimentů s neutrálním selektorem dle Aminiho a Westerlunda.

l_L / m	0	0,0018	0,0036	0,0072	0,0108	0,0144	0,0180	0,0216	0,0252	0,041
$X / \%$	0	4,4	8,8	17,6	26,3	35,1	43,9	52,7	61,4	100

Dle Aminiho a Westerlunda je podmínkou pro stanovení komplexační konstanty lineární závislost výrazu $\mu_{\text{obs}} - \mu_A(1 - X)$ na X .



Obr. 3: Závislosti $\mu_{\text{obs}} - \mu_A(1 - X)$ na X sestavené na základě dat získaných simulacemi PF systémů při konstantní koncentraci selektoru $7,6 \text{ mmol dm}^{-3}$ a rozdílné hodnotě K_{AL} (dle Aminiho a Westerlunda). Parametry simulace jsou uvedeny v Tabulce 2. Hodnoty K_{AL} jsou uvedeny v $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$.

Simulacemi bylo prokázáno, že linearita této závislosti je ovlivněna hodnotou součinu $K_{\text{AL}} L$. Na Obr. 3 jsou zobrazeny grafy závislosti $\mu_{\text{obs}} - \mu_A(1 - X)$ na X pro pět různých hodnot komplexačních konstant při konstantní hodnotě L . Jak je z obrázku patrné, při vyšších hodnotách součinu $K_{\text{AL}} L$ dochází k odchylkám závislosti od linearity a to v oblasti nízkých hodnot X . Odchyly od linearity jsou tím výraznější, čím vyšší je hodnota součinu $K_{\text{AL}} L$.

Simulace PF dle Nilssona

Vstupní parametry simulací jsou uvedeny v Tabulce 4. Obdobně jako v předchozím případě byla kapilára rozdělena na tři části. Proměnnými vstupními parametry simulací byly kromě délky zóny selektoru také pohyblivosti selektoru a komplexu.

Tabulka 4: Parametry PF simulací s nabitým selektorem (dle Nilssona³⁹). Hranaté závorky označují analytickou koncentraci.

Simulace	mřížkové body	3000	Analyt	pK_a	9,3
	šířka píku / m	2×10^{-5}		z	+1
Kapilára	L_{tot} / m	$4,7 \times 10^{-2}$		$\mu_A / \text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$20,0 \times 10^{-9}$
	L_{eff} / m	4×10^{-2}		$[A] / \text{mmol dm}^{-3}$	0,10
	r / m	$2,5 \times 10^{-5}$			
Systém			Selektor	pK_a	3
	U / V	200		z	-3
	pH	6,540		$\mu_L / \text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	proměnná
	t / °C	25		$[L] / \text{mmol dm}^{-3}$	8,50
BGE	[BISTRIS] / mmol dm ⁻³	50	Komplex	K_{AL} / M^{-1}	2187
	$[\text{Cl}^-] / \text{mmol dm}^{-3}$	50		pK_{AL}	-3,34
	$[\text{K}^+] / \text{mmol dm}^{-3}$	29		$\mu_{AL} / \text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	proměnná

Hodnoty pohyblivostí selektoru a komplexu použité při simulacích jsou uvedeny v Tabulce 5. V Tabulce 6 jsou uvedeny použité délky zón selektoru.

Tabulka 5: Hodnoty pohyblivostí selektoru μ_L a komplexu μ_{AL} použité při PF simulacích s nabitým selektorem (dle Nilssona). $\Delta\mu$ označuje rozdíl pohyblivostí selektoru a komplexu.

Systém č.	$\mu_L / 10^{-9} \text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\mu_{AL} / 10^{-9} \text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Delta\mu / 10^{-9} \text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$
1	3,0	3,0	0
2	5,0	4,95	0,05
3	0,2	0,1	0,1
4	10	9	1
5	5	1	4
6	10	1	9
7	0	10	10

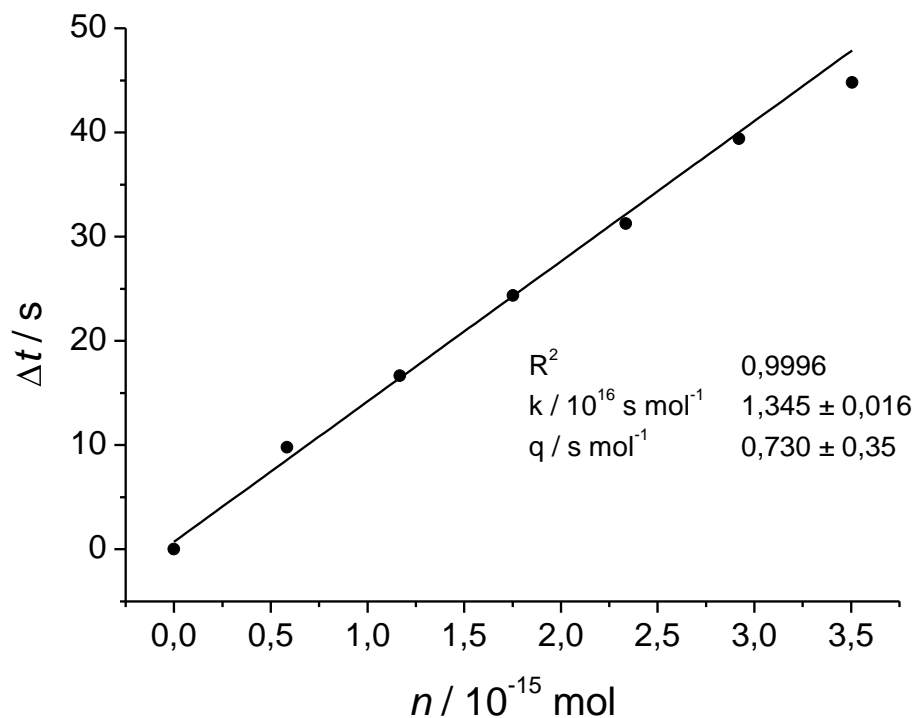
Tabulka 6: Délky zón selektoru l_L a procentuální poměr délek zón selektoru ku efektivní délce kapiláry X použitých při PF simulacích s nabitým selektorem (dle Nilssona).

l_L / cm	0	0,35	0,70	1,05	1,40	1,75	2,00
X / %	0	7,4	14,9	22,3	24,8	37,2	44,7

Podmínkou pro využití přístupu ke stanovení komplexační konstanty dle Nilssona je splnění nerovnosti (13). Je-li rozdíl pohyblivosti komplexu a volného selektoru mnohem menší než pohyblivost samotného analytu, je možné ve výpočtech ztotožnit pohyblivost volného selektoru s pohyblivostí komplexu, čímž dojde k podstatnému zjednodušení výpočtu. Cílem simulací bylo zjistit, jak malý rozdíl v pohyblivosti komplexu a volného selektoru musí být, aby ztotožnění jejich pohyblivostí neovlivnilo hodnotu získané komplexační konstanty.

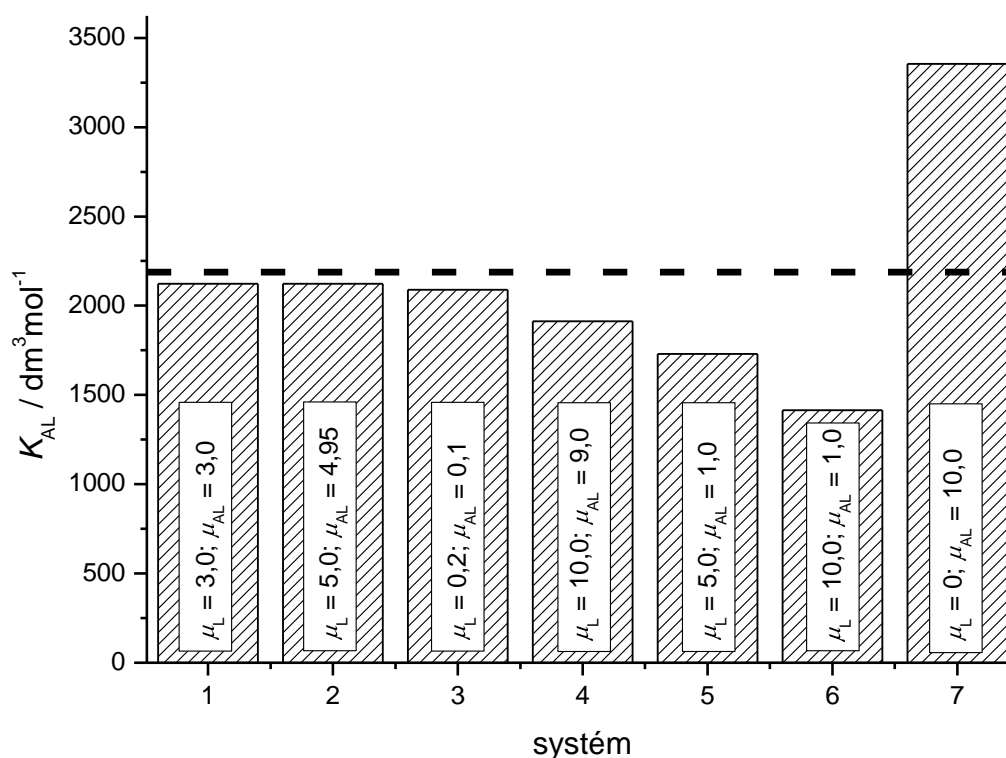
Simulacemi PF experimentů podle Nilssona lze při proměnných pohyblivostech volného selektoru a komplexu sledovat rozdíly v migračních časech analytu v přítomnosti a nepřítomnosti selektoru, Δt . Na základě závislosti získaných rozdílů migračních časů na celkovém látkovém množství selektoru v kapiláře, n , lze určit příslušnou komplexační konstantu (rovnice (17)). Pohyblivosti volného selektoru a komplexu použité k simulacím jsou uvedeny v Tabulce 5. Pohyblivosti byly voleny tak, aby pokryly interval pomalu migrujících látek. Rozdíl v pohyblivostech komplexu a volného selektoru byl volen od 0 do 50 % pohyblivosti volného analytu.

Na Obr. 4 je uvedena závislost Δt na n pro PF systém s konkrétně zvolenými hodnotami pohyblivosti $\mu_A = -20,0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, $\mu_L = 5,0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ a $\mu_{AL} = 4,95 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$.



Obr. 4: Graf závislosti Δt na n sestavený na základě dat získaných simulacemi PF experimentů s hodnotami $\mu_A = -20,0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, $\mu_L = 5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ a $\mu_{AL} = 4,95 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ (dle Nilssona). Parametry simulace jsou uvedeny v Tabulce 4.

Hodnoty zdánlivých komplexačních konstant pro systémy uvedené v Tabulce 5 získané vyhodnocením příslušných lineárních závislostí jsou zobrazeny na Obr. 5.



Obr. 5: Hodnoty K_{AL} v závislosti na parametrech simulací zvolených systémů (viz Tabulka 4 a Tabulka 5). Čárkovaně je vyznačena vkládaná hodnota K_{AL} ($K_{AL} = 2187 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$). Hodnoty μ_L a μ_{AL} jsou uváděny v jednotkách $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Sloupcový graf demonstruje vliv rozdílu pohyblivostí μ_L a μ_{AL} a také vliv vlastních pohyblivostí selektoru a komplexu na hodnotu stanovené komplexační konstanty. Z obrázku je vidět, že zatímco hodnoty komplexačních konstant pro systémy s malým rozdílem pohyblivostí jsou s vloženou hodnotou komplexační konstanty srovnatelné (systémy 1-3), se zvětšujícím se rozdílem pohyblivostí se zvětšuje i rozdíl mezi těmito hodnotami (systémy 4-6). Systém 7 představuje pro srovnání námi dále zkoumané systémy s nulovou pohyblivostí selektoru a nenulovou pohyblivostí komplexu. Graf porovnání komplexačních konstant získaných využitím simulovaných dat jednoznačně potvrzuje, že ke stanovení komplexačních konstant PF metodou dle Nilssona musí zkoumaný systém splňovat podmínku (13).

Dle Nilssona³⁹ je výhodou tohoto způsobu stanovení komplexačních konstant nezávislost stanovení na délce zóny nebo na koncentraci selektoru. Stanovení závisí pouze na celkovém množství selektoru v kapiláře. Ověření tohoto tvrzení bylo cílem dalších simulací. Sérii simulací tvořily systémy s proměnnými koncentracemi selektoru a s proměnnými délkami zón selektoru v kapiláře při zachování prakticky konstantního látkového množství selektoru v kapiláře. V Tabulce 7 jsou uvedeny při simulacích použité koncentrace selektoru a délky zón selektoru společně se simulovanými migračními časy analytů. Rozdíl mezi migračním časem analytu v systému s nejkratší a nejdelší zónou selektoru je 3,3 s, což odpovídá 0,7 % migračního času příslušného analytu.

Tabulka 7: Parametry systému pro simulace PF experimentů s prakticky konstantní hodnotou látkového množství selektoru v kapiláře. Ostatní parametry simulací jsou uvedeny v Tabulce 4.

l_L / cm	$[L]$ / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	n / 10^{-16} mol	$t_{A,\text{mig}}$ / s
0,35	125,7	8,64	486,3
0,5	88,0	8,64	484,2
0,8	55,0	8,64	483,6
1,2	36,6	8,62	483,3
1,8	24,4	8,62	483,1
2,7	16,3	8,64	483,0

Počítačová simulace PF experimentů potvrdila publikované požadavky kladené autory na postupy stanovení komplexačních konstant touto metodou. Simulacemi bylo jednoznačně potvrzeno, že stanovení komplexační konstanty přístupem podle Nilssona je závislé pouze na celkovém látkovém množství selektoru v kapiláře, efektivní délce a vnitřním průměru kapiláry.

Poznatky o průběhu PF experimentů získaných jejich počítačovou simulací a hodnoty komplexačních konstant námi zvolených profenů (S-Flu, S-Ibu, S-Keto a S-Napro) s β -CD stanovené v práci³⁰ poukazují na nevhodnost použití PF metody dle Nilssena ke stanovení komplexačních konstant námi zvolených systémů. Naopak, počítačové

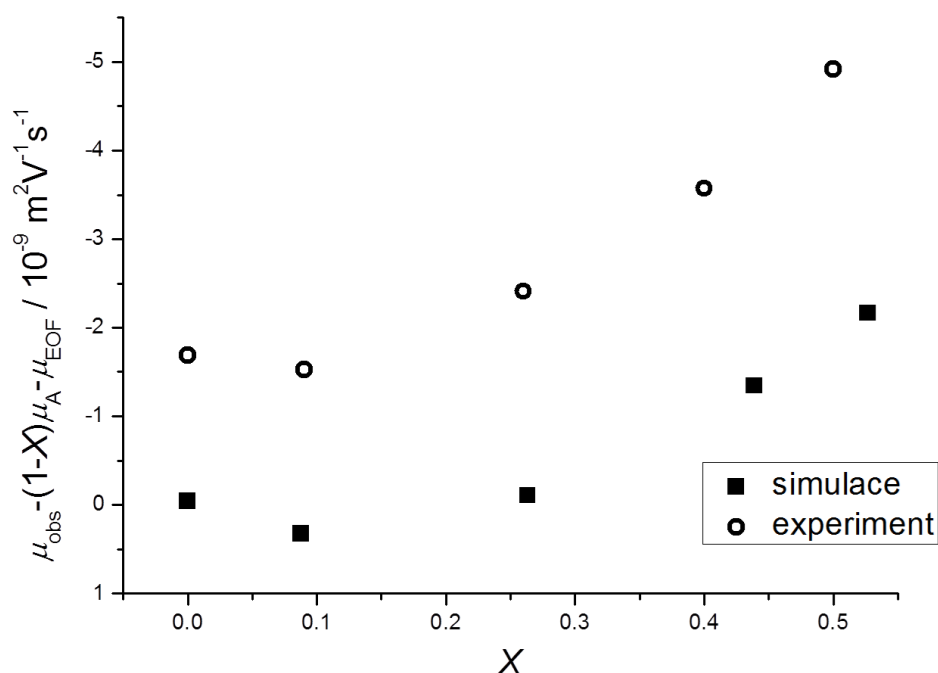
simulace prokázaly, že PF metoda podle Aminiho a Westerlunda může být použita ke stanovení komplexačních konstant námi zvolených systémů za předpokladu, že součin komplexačních konstant systémů a koncentrace použitého selektoru $K_{AL} L$ nebude vyšší než 1,5.

4.1.2 PF experimenty

PF experimenty byly provedeny pro ověření shody výsledků počítačových simulací s reálnými elektroforetickými separacemi a pro stanovení komplexačních konstant vybraných profenů s β -CD a jejich porovnání s hodnotami stanovenými metodou ACE. Vzhledem k nevhodnosti využití přístupu dle Nilssena pro námi zvolené systémy byly provedeny pouze experimenty s přístupem dle Aminiho a Westerlunda

Simulace versus experiment

Pro ověření shody počítačové simulace s experimentem byla proměřena závislost $\mu_{obs} - \mu_A$ na $1 - X$ pro *R*-Flu a *S*-Ibu komplexujících s β -CD přístupem podle Aminiho a Westerlunda. Na základě poznatků získaných simulacemi není tento přístup vhodný pro stanovení komplexačních konstant silně komplexujících systémů při současném použití vyšších koncentrací selektoru. Komplexační konstanty *R*-Flu a *S*-Ibu s β -CD dosahují hodnot asi $5\,000\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}$ (cit. 30). Při současném použití selektoru o koncentraci 3 mmol dm^{-3} (odpovídá $K_{AL}[L] = 15$) se závislost výrazu $\mu_{obs} - \mu_A$ na $1 - X$ značně odchyluje od linearity, jak bylo simulacemi předpovězeno i experimentálně prokázáno. Porovnání simulované a experimentální závislosti výrazu $\mu_{obs} - \mu_A$ na $1 - X$ pro *S*-Ibu komplexující s β -CD je ukázáno na Obr. 6. Obě závislosti vykazují obdobný trend. Vzájemný posun závislostí vzhledem k hodnotám na ose závisle proměnné je pravděpodobně způsoben použitím odhadované hodnoty komplexační konstanty při simulacích. Nicméně simulacemi předpovězený trend závislosti $\mu_{obs} - \mu_A$ na $1 - X$ pro součin $K_{AL} L > 1,5$ byl experimentálně potvrzen.



Obr. 6: Závislost $\mu_{\text{obs}} - \mu_A(1 - X)$ na X pro systémy s hodnotou $K_{\text{AL}} L \gg 1,5$; ■ označuje data získaná počítačovou simulací, ○ označuje experimentálně stanovená data. Pro demonstraci experimentálních dat byl použit systém S-Ibu s 3 mmol dm^{-3} β -CD v 20 mmol dm^{-3} T/T pufru, experimentální pH = 8,56, IS = 10 mmol dm^{-3} a teplota 25 °C; parametry kapiláry viz kapitola 3.1.

Stanovení komplexačních konstant

Vlivem elektromigrační disperze⁴⁷ neměly píky analytů na elektroferogramech gaussovský tvar, ale nabývaly charakteristického elektromigrační disperzí deformovaného trojúhelníkovitého tvaru. Z tohoto důvodu nebyl migrační čas analytů odečítán z časové pozice maxima píku, ale píky analytů byly prokládány Haarhoff-van der Lindeho (HVL) funkcí^{48,49}, z jejichž parametrů lze získat hodnotu migračního času⁵⁰.

Dle literatury³⁰ se komplexační konstanty popisující komplexace S-Keto a S-Napro s β -CD pohybují okolo $500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ a tedy závislost $\mu_{\text{obs}} - \mu_A(1 - X)$ na X při použití 3 mmol dm^{-3} β -CD by měla být prakticky lineární ($K_{\text{AL}} L = 1,5$). Obdobně u systémů

R-Flu a S-Ibu s β -CD, kde se hodnoty komplexačních konstant pohybují okolo

5 000 dm³ mol⁻¹, je podmínka linearit výše zmíněné závislosti splněna při použití 0,2mmol dm⁻³ β-CD a závislost by měla být lineární. Závislosti $\mu_{\text{obs}} - \mu_A$ na X jsou zobrazeny na Obr. 7 a proloženy přímkou dle rovnice (7).

Stanovené směrnice lineární závislosti, k , z Obr. 7 byly na základě rovnic (5) a (7) použity k výpočtu komplexačních konstant dle rovnice

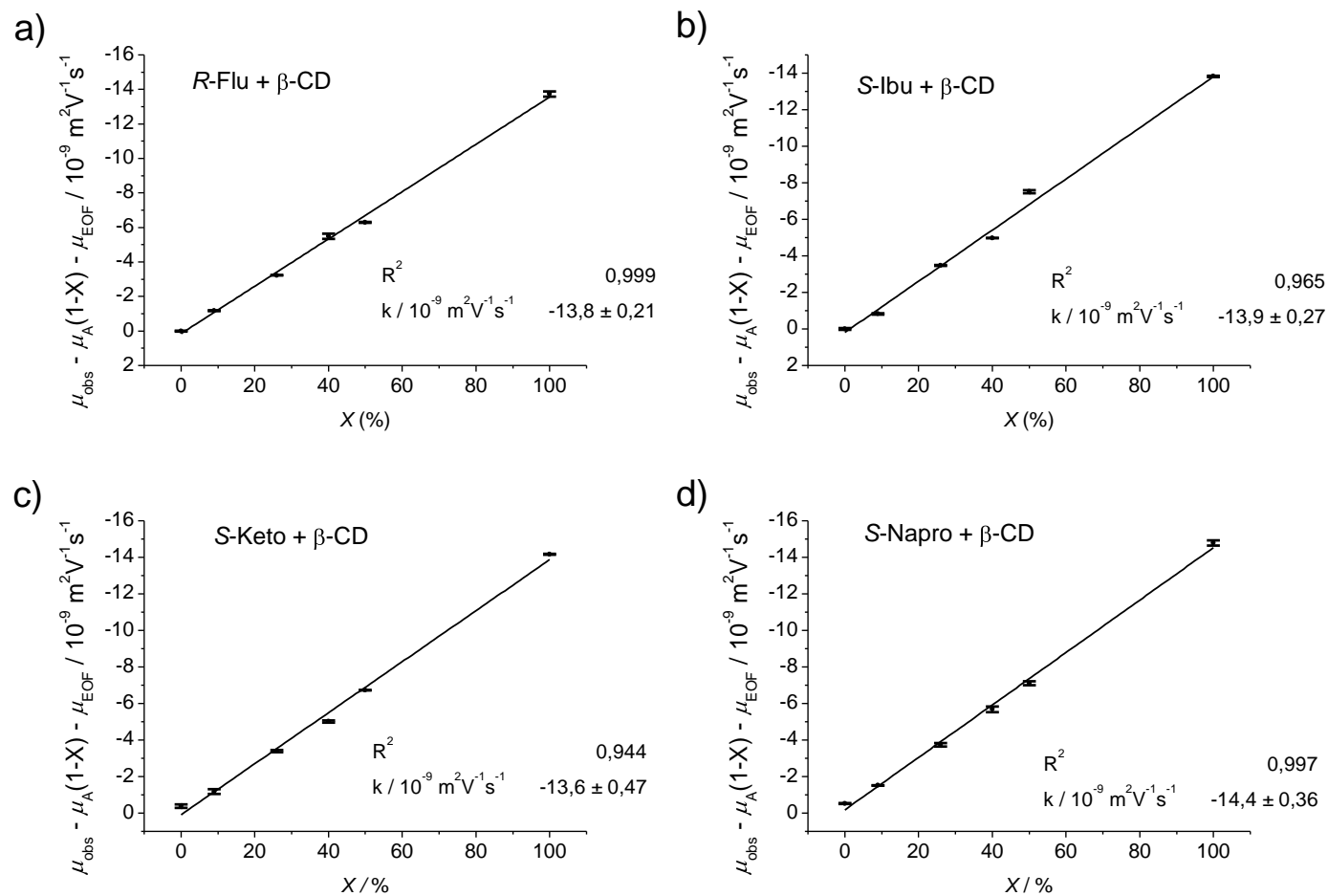
$$K'_{\text{AL}} = \frac{k - \mu_A}{L \mu_{\text{AL}} - k}. \quad (25)$$

Za pohyblivost čistého analytu μ_A byla ve výpočtu použita hodnota průměrné pozorované pohyblivosti analytu μ_{obs} v nepřítomnosti selektoru (viz Tabulka 8), tedy při délce zóny selektoru 0 %. Pohyblivost komplexu μ_{AL} byla stanovena v předešlé práci³⁰ metodou ACE.

Tabulka 8: Hodnoty K'_{AL} a μ_{obs} systémů *R*-Flu, *S*-Ibu, *S*-Keto a *S*-Napro s β-CD stanovené PF metodou, podle Aminiho a Westerlunda.

analyt	$K'_{\text{AL}} / 10^2 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$\mu_{\text{obs}} / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
<i>R</i> -Flu	58 ± 5	-18,8 ± 0,03
<i>S</i> -Ibu	65 ± 7	-19,7 ± 0,06
<i>S</i> -Keto	4,7 ± 0,6	-20,3 ± 0,10
<i>S</i> -Napro	4 ± 1	-21,52 ± 0,02

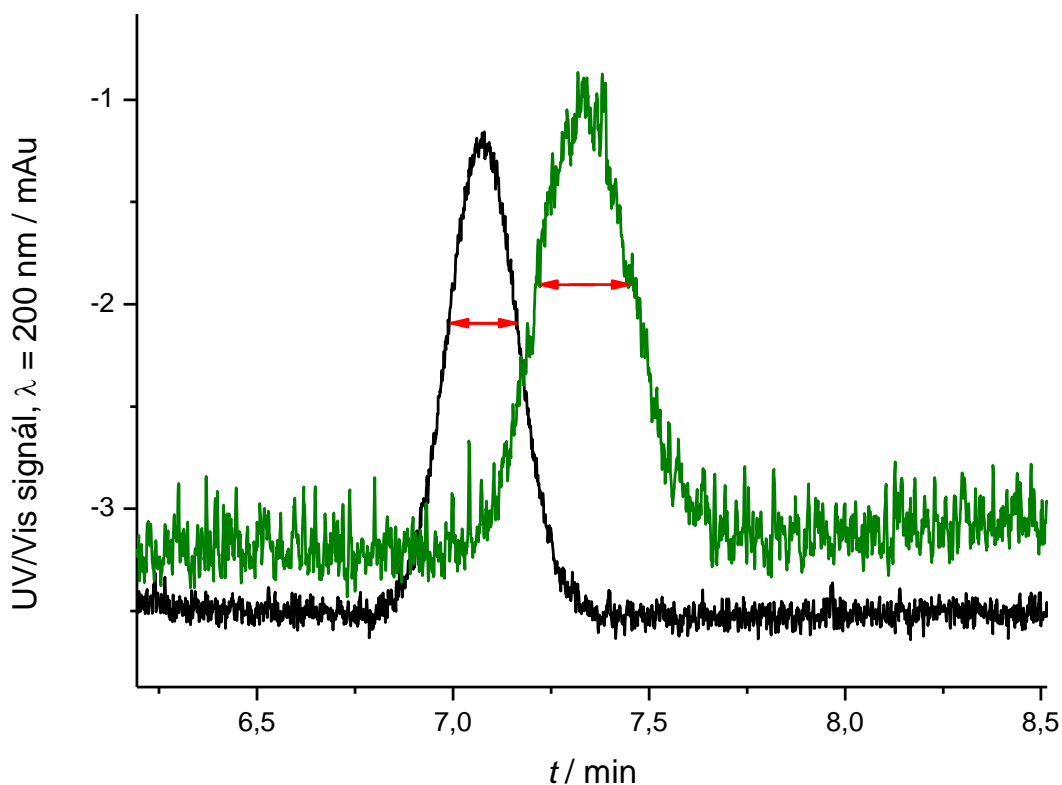
Hodnoty stanovených komplexačních konstant pro oba systémy jsou uvedeny v Tabulce 8. Na grafech uvedených na Obr. 7 lze pozorovat drobné odchylky experimentální závislosti od linearit, což pravděpodobně vede k chybě stanovení, taktéž uvedené v Tabulce 8.



Obr. 7: Experimentální závislost $\mu_{\text{obs}} - \mu_A(1 - X)$ na X pro systémy a) R-Flu s β-CD, b) S-Ibu s β-CD, c) S-Keto s β-CD a d) S-Napro s β-CD. Experimentálními daty je proložena přímka. Experimentální podmínky: 20mmol dm⁻³ T/T pufr o pH=8,56 a IS=10 mol dm⁻³ při teplotě 25 °C, c(β-CD) = 3 mmol dm⁻³; parametry kapiláry viz kapitola 3.1.

4.2 FIDA metoda

Hodnotu komplexační konstanty lze podle rovnice (24) určit ze závislosti detekčního času vztaženého na časový rozptyl píku, $t_D \sigma^2$, na koncentraci selektoru v základním elektrolytu. K rozmývání píku analytu v kapiláře dochází v důsledku Taylorovy disperze. Jelikož FIDA experimenty nevyužívají napětí aplikované na kapiláru, je rozmytí píku zapříčiněno pouze laminární difuzí. Toto rozmytí (časový rozptyl píku) je tím větší, čím delší je čas, po který mohl analyt difundovat, nebo čím menší má analyt difuzivitu (difuzní koeficient). Vzhledem k následné korekci časového rozptylu píku detekčním časem (viz rovnice (22)) byly změny v rozmytí píků způsobeny změnami difusního koeficientu analytu v důsledku komplexace se selektorem. Rozmytí píku vzniklé změnou difuzivity analytu v důsledku komplexace je ukázáno na Obr. 8.



Obr. 8: Záznam odezvy UV detektoru FIDA systému S-Ibu ($0,06 \text{ mmol dm}^{-3}$) v 20 mmol dm^{-3} T/T pufru (plná čára) a v 20 mmol dm^{-3} T/T pufru s přidavkem 10 mmol dm^{-3} β -CD (čárkovaná čára); $\text{pH}=8,56$ a $\text{IS}=10 \text{ mmol dm}^{-3}$, 25°C ; parametry kapiláry viz kapitola 3.1. Protlačováno externím tlakem 50 mbar.

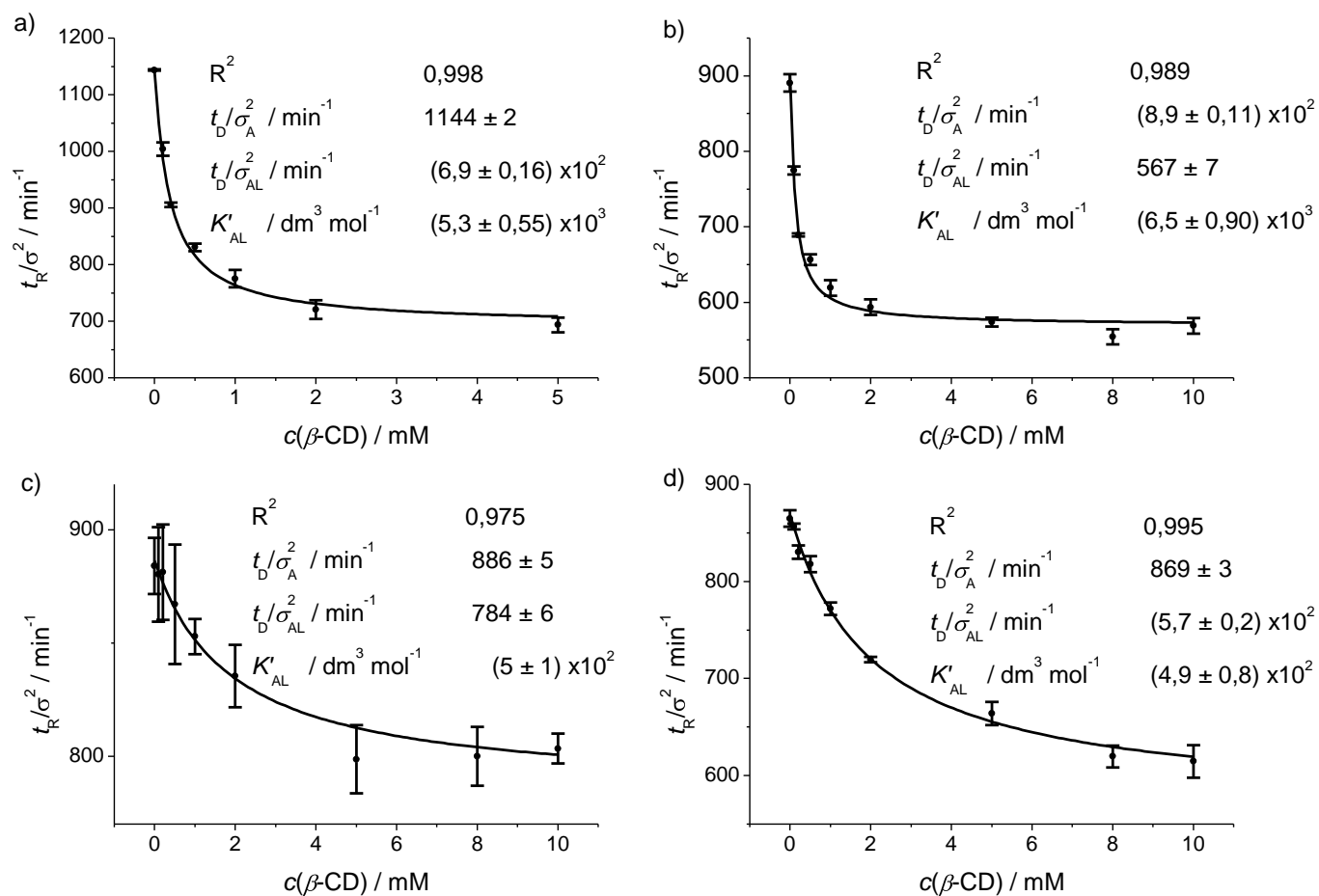
Ke stanovení časového rozptylu píku σ^2 byly jednotlivé píky proloženy Gaussovou funkcí

$$y = y_0 + \frac{A}{w \frac{\pi}{2}} e^{-2 \frac{(x-x_c)^2}{w^2}}, \quad (26)$$

kde y_0 značí posunutí signálu od základní linie, x_c střed píku, w šířku píku v inflexním bodě a A plochu píku. Hodnota časového rozptylu píku σ^2 byla poté vypočtena podle vztahu

$$\sigma^2 = \frac{w^2}{4}. \quad (27)$$

Hodnoty výrazu $t_D \sigma^2$, kde t_D je detekční čas analytu (čas, při kterém procházel analyt detektorem) byly vyneseny do grafu v závislosti na molární koncentraci selektoru (Obr. 9). Vynesenou závislostí byla proložena křivka podle rovnice (24). Koncentrace volného (nezkomplexovaného) selektoru $[L]$ byla nahrazena celkovou koncentrací selektoru, neboť úbytek množství volného selektoru komplexací je vzhledem k nadbytku selektoru oproti analytu prakticky zanedbatelný.



Obr. 9: Závislost t_R/σ^2 na koncentraci β -CD pro *R*-Flu (a), *S*-Ibu (b), *S*-Keto (c) a *S*-Napro (d); v 20mmol dm⁻³ T/T pufru o pH=8,56, IS=10 mol dm⁻³ při 25 °C, parametry kapiláry viz kapitola 3.1. Experimentálně získanými body je proložena křivka dle rovnice (24). Vynášené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 9: Hodnoty t_R/σ^2 pro FIDA systémy *R*-Flu, *S*-Ibu, *S*-Keto a *S*-Napro s β -CD v 20mmol dm⁻³ T/T pufru o experimentálním pH=8,56 a IS=10 mmol dm⁻³.

[L]	<i>R</i> -Flu	<i>S</i> -Ibu	<i>S</i> -Keto	<i>S</i> -Napro
/ mmol dm ⁻³	t_R/σ^2 / 10 ² min ⁻¹	t_R/σ^2 / 10 ² min ⁻¹	t_R/σ^2 / 10 ² min ⁻¹	t_R/σ^2 / 10 ² min ⁻¹
0	11,82 ± 0,40	8,91 ± 0,11	8,84 ± 0,12	8,65 ± 0,09
0,1	10,04 ± 0,10	7,75 ± 0,05	8,80 ± 0,21	8,57 ± 0,03
0,2	9,04 ± 0,30	6,89 ± 0,02	8,81 ± 0,21	8,30 ± 0,07
0,5	8,30 ± 0,07	6,56 ± 0,07	8,67 ± 0,25	8,18 ± 0,08
1	7,99 ± 0,20	6,19 ± 0,10	8,53 ± 0,08	7,72 ± 0,07
2	7,04 ± 0,10	5,93 ± 0,10	8,35 ± 0,14	7,19 ± 0,03
5	7,01 ± 0,15	5,73 ± 0,06	7,99 ± 0,15	6,64 ± 0,12
8	-	5,54 ± 0,04	8,00 ± 0,13	6,20 ± 0,02
10	-	5,69 ± 0,10	8,03 ± 0,07	6,1 ± 0,17

Z grafického znázornění na Obr. 9 je patrné, že s rostoucí koncentrací selektoru dochází k poklesu hodnoty t_D/σ^2 . Tento pokles je způsoben snižující se hodnotou efektivního difusního koeficientu analytu v důsledku komplexace analytu. Tento pokles je prudší u systémů s vyšší hodnotou komplexační konstanty (Obr. 9a, b). Z grafů na Obr. 9 je také zřejmé, že hodnota poměru t_D/σ^2 limituje k hodnotě t_D/σ^2 čistého komplexu. Hodnoty stanovených komplexačních konstant pro jednotlivé systémy jsou shrnuty v Tabulce 10. Získané komplexační konstanty nebyly korigovány na iontovou sílu základního elektrolytu a lze je tedy považovat za zdánlivé komplexační konstanty platící pouze pro zvolený systém.

Tabulka 10: Hodnoty komplexačních konstant systémů profen-β-CD stanovené metodou FIDA. BGE 20mmol dm⁻³ T/T pufr o IS 10 mmol dm⁻³ při teplotě 25 °C.

Analyt	$K'_{AL} / 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$
<i>R</i> -Flurbiprofen	5,3 ± 0,50
<i>S</i> -Ibuprofen	6,5 ± 0,9
<i>S</i> -Ketoprofen	0,5 ± 0,1
<i>S</i> -Naproxen	0,49 ± 0,08

Z údajů uvedených v Tabulce 10 je patrné, že hodnoty komplexačních konstant jsou zatíženy chybou asi 10 % u *R*-Flu až 20 % u *S*-Keto. Vyšší chybu stanovení, obzvláště u *S*-Keto, lze pravděpodobně přičíst proměnné teplotě v kapiláře v průběhu měření vzhledem k okolním podmínkám a chladicím možnostem přístroje.

4.3 Diskuse

Komplexační konstanty *R*-Flu, *S*-Ibu, *S*-Keto a *S*-Napro s β -CD byly stanoveny metodami PF a FIDA využívající aparaturu pro kapilární elektroforézu. Stanovené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 11. Pro porovnání jsou v Tabulce 11 uvedeny i hodnoty příslušných komplexačních konstant získaných metodou ACE³⁰. Porovnáním stanovených hodnot lze konstatovat, že hodnoty komplexačních konstant slaběji komplexujících systémů jsou u všech použitých postupů srovnatelné. Nicméně hodnoty komplexačních konstant získané metodami PF a FIDA jsou zatíženy vyšší hodnotou experimentální chyby. V rámci experimentální chyby lze stanovené hodnoty považovat za srovnatelné.

Tabulka 11: Hodnoty komplexačních konstant stanovených metodami PF, FIDA a ACE ve 20mmol dm⁻³ T/T pufru o experimentální hodnotě pH 8,56 a IS = 10 mol dm⁻³ při teplotě 25 °C. Konstanty nejsou korigovány na iontovou sílu BGE.

Analyt	$K'_{AL} / 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$		
	FIDA	PF	ACE
<i>R</i> -Flu	5,3 ± 0,55	5,8 ± 0,5	4,9 ± 0,1
<i>S</i> -Ibu	6,5 ± 0,9	6,5 ± 0,7	6,6 ± 0,27
<i>S</i> -Keto	0,5 ± 0,13	0,47 ± 0,06	0,547 ± 0,007
<i>S</i> -Napro	0,49 ± 0,08	0,4 ± 0,1	0,506 ± 0,006

Všechny tři použité metody jsou vhodné ke studiu komplexačních rovnováh a ke stanovení příslušných komplexačních konstant. Nicméně použitelnost jednotlivých technik závisí na konkrétním komplexujícím systému.

Použití PF metody podle Nilssona³⁹ je možné pouze v případě, kdy vlivem komplexace nedochází ke změně migrační rychlosti volného selektoru. Splnění takové podmínky lze očekávat např. u systémů, v nichž jako selektor slouží velká molekula. Použití PF metody podle Aminiho³⁵ je podmíněno linearitou závislosti výrazu $\mu_{\text{obs}} - \mu_A(1 - X)$ na X . Z provedených počítačových simulací i experimentů vyplývá, že diskutovaná závislost je lineární pouze v případě nízké hodnoty komplexační konstanty daného systému a/nebo za použití nízkých koncentrací selektoru, respektive do hodnoty součinu $K_{AL} L = 1,5$. Pro využití PF metody jsou tedy vhodné systémy s co nejnižší

hodnotou součinu $K_{AL} L$, neboť i drobné odchylky sledované závislosti od linearit vedou ke značné chybě stanovení.

Metodu FIDA lze teoreticky použít pro všechny typy komplexujících systémů, na rozdíl od PF a ACE metody, kde je nezbytná přítomnost buď nabitého analytu, nebo selektoru, případně obou složek. Stanovení komplexační konstanty metodou FIDA není ve srovnání s PF metodou limitováno hodnotou součinu $K_{AL} L$ a je tedy použitelnou metodou pro studium systémů s prakticky libovolnou hodnotou K_{AL} . Nicméně, s klesající hodnotou komplexační konstanty, kdy dochází v důsledku komplexace jen k nepatrným změnám pozorovaného difusního koeficientu, a tím pádem i k nepatrným změnám časového rozptylu, rostou nároky na citlivost detekčního zařízení. Tomu se dá předejít například prodloužením času, po který může analyt/komplex difundovat, avšak prodlouží se tím i časová náročnost experimentu. Dalším omezením metody FIDA je nemožnost stanovování komplexačních konstant systémů, u nichž v důsledku komplexace prakticky nedochází ke změně difusního koeficientu sledovaného analytu (například komplexací velké molekuly analytu s malou molekulou selektoru). Ve srovnání s metodou ACE poskytuje FIDA metoda prakticky totožné hodnoty komplexačních konstant.

5. Závěr

Metodou FIDA byly stanoveny komplexační konstanty všech čtyřech námi zvolených systémů. Hodnoty takto stanovených komplexačních konstant byly v rámci experimentální chyby srovnatelné s hodnotami získanými metodou ACE. Ve srovnání s metodou ACE však byly hodnoty stanovené metodou FIDA zatíženy větší experimentální chybou. Výhodou metody FIDA je, že s její pomocí lze stanovovat i komplexační konstanty systémů, v nichž jsou analyt i selektor neutrální. Nevýhodou této metody může být vyšší časová náročnost experimentů u systému s nízkými hodnotami komplexační konstanty. Další nevýhodou je pak nemožnost užití metody FIDA pro stanovení komplexačních konstant systémů, u kterých nedochází ke změně difusního koeficientu analytu v důsledku komplexace.

Metodou PF byly také stanoveny komplexační konstanty všech čtyřech námi zvolených systémů. Přístup podle Nilssena se v důsledku simulací ukázal pro námi zvolené systémy nevhodným. Komplexační konstanty všech čtyřech systémů byly stanoveny přístupem podle Aminiho a Westerlunda. Hodnoty komplexačních konstant získané metodou PF jsou v rámci experimentální chyby srovnatelné s hodnotami získanými metodou ACE. Na rozdíl od ní jsou, obdobně jako hodnoty stanovené metodou FIDA, ale zatíženy vyšší experimentální chybou. Výhoda přístupu podle Aminiho a Westerlunda spočívá především v možnosti vyhodnocování lineární závislosti, na rozdíl od hyperbolické, které se využívá v ACE, a jejím přesnějším proložení, zejména u slabě interagujících systémů ($K_{AL} < 100 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$).

Obě námi zkoumané metody poskytují pro námi zvolené systémy shodné hodnoty komplexačních konstant s hodnotami získanými metodou ACE a mohou být použity ke studiu komplexačních interakcí.

Literatura

- ¹ Jensen, H.; Larsen, L. C.; Østergaard, J.: *J. Drug Del. Sci. Tech.* **23**, 333-345 (2013)
- ² Gaš, B.; Jaroš, M.; Hruška, V.; Zusková, I.; Štědrý, M.: *LC GC EUR.* **18**, 282-288 (2005)
- ³ Jaroš, M.; Hruška, V.; Štědrý, M.; Zusková, I.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **25**, 3080-3085 (2004)
- ⁴ Hruška, V.; Beneš, M.; Svobodová, J.; Zusková, I.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **33**, 938-947 (2012)
- ⁵ Rundlett, K. L.; Armstrong, D. W.: *Electrophoresis* **22**, 1419-1427 (2001)
- ⁶ Jiang, C.; Armstrong, D. W.: *Electrophoresis* **31**, 17-27 (2010)
- ⁷ Tanaka, T.; Terabe, S.: *J. Chromatogr. B* **768**, 81-92 (2002)
- ⁸ Jensen, H.; Østergaard, J.: *J. Am. Chem. Soc.* **132**:12, 4070-4071 (2010)
- ⁹ Valtcheva, L.; Mohammad, J.; Pettersson, G.; Hjertén, S.: *J. Chromatogr.* **638**, 263-267 (1993)
- ¹⁰ Dose, E. V.; Guiochon, G. A.: *Anal. Chem.* **63**, 1063-1072 (1991)
- ¹¹ Thormann, W.; Caslavská, J.; Breadmore, M. C.; Mosher, R. A.: *Electrophoresis* **30**, 16-26 (2009)
- ¹² Thormann, W.; Breadmore, M. C.; Caslavská, J.; Mosher, R. A.: *Electrophoresis* **31**, 726-754 (2010)
- ¹³ Gaš, B.: *Electrophoresis* **30**, 7-15 (2009)
- ¹⁴ Bercovici, M.; Lele, S. K.; Santiago, J. G.: *J. Chromatogr. A* **1216**, 1008-1018 (2009)
- ¹⁵ Bercovici, M.; Lele, S. K.; Santiago, J. G.: *J. Chromatogr. A* **1217**:4, 588-599 (2010)
- ¹⁶ Thormann, W.; Zhang, C. X.; Caslavská, J.; Gebauer, P.; Mosher, R. A.: *Anal. Chem.* **70**, 549-562 (1998)
- ¹⁷ Mao, Q.; Pawliszyn, J.; Thormann, W.: *Anal. Chem.* **72**, 5493-5502 (2000)
- ¹⁸ Breadmore, M. C.; Mosher, R. A.; Thormann, W.: *Anal. Chem.* **78**, 538-546 (2006)
- ¹⁹ Hruška, V.; Jaroš, M.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **27**, 984-991 (2006)
- ²⁰ Aris, R.: *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A* **235**, 67-77 (1956)
- ²¹ Taylor, G.: *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A* **219**, 186-203 (1953)
- ²² Mosher, R. A.; Breadmore, M. C.; Thormann, W.: *Electrophoresis* **32**, 532-541 (2011)

-
- ²³ Svobodová, J.; Beneš, M.; Hruška, V.; Ušelová, K.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **33**, 948-957 (2012)
- ²⁴ Svobodová, J.; Beneš, M.; Dubský, P.; Vigh, G.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **33**, 3012-3020 (2012)
- ²⁵ Hruška, V.; Beneš, M.; Svobodová, J.; Zusková, I.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **33**, 938-947 (2012)
- ²⁶ Breadmore, M. C.; Kwan, H. Y.; Caslavská, J.; Thormann, W.: *Electrophoresis* **33**, 958-969 (2012)
- ²⁷ Rawjee, Y. Y.; Vigh, G.: *Anal. Chem.* **66**, 619-627 (1994)
- ²⁸ Beneš, M.; Zusková, I.; Svobodová, J.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **33**, 1032-1039 (2012)
- ²⁹ Ušelová-Včeláková, K.; Zusková, I.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **28**, 2145-2152 (2007)
- ³⁰ Riesová, M.; Svobodová, J.; Ušelová, K.; Tošner, Z.; Zusková, I.; Gaš, B.: *J. Chromatogr. A* **1364**, 276-288 (2014)
- ³¹ Østergaard, J.; Jensen, H.; Holm, R.: *J. Sep. Sci.* **32**, 1712-1721 (2009)
- ³² Britz-McKibbin, P.; Chen, D. D. Y.: *Electrophoresis* **23**, 880-888 (2002)
- ³³ Evenhuis, C. J.; Hruška, V.; Guijt, R. M.; Gaš, B.; Marriott, P. J.; Hadad, P. R.: *Electrophoresis* **28**, 3759-3766 (2007)
- ³⁴ Tanaka, Y.; Terabe, S.: *J. Chromatogr. A* **694**, 277-284 (1995)
- ³⁵ Amini, A.; Westerlund, D.: *Anal. Chem.* **70**, 1425-1430 (1998)
- ³⁶ Grard, S.; Morin, P.; Dreux, M.; Ribet, J. P.: *J. Chromatogr. A* **926**, 3-10 (2001)
- ³⁷ Tanaka, Y.; Otsuka, K.; Terabe, S.: *J. Chromatogr. A* **875**, 323-330 (2000)
- ³⁸ Amini, A.; Merclin, N.; Bastami, S.; Westerlund, D.: *Electrophoresis* **20**, 180-188 (1999)
- ³⁹ Nilsson, M.; Harang, V.; Bergström, M.; Ohlson, S.; Isaksson, R.; Johansson, G.: *Electrophoresis* **25**, 1829-1836 (2004)
- ⁴⁰ Amundsen, L. K.; Sirén, H.: *Electrophoresis* **28**, 3737-3744 (2007)
- ⁴¹ Mito, E.; Gomez, F. A.: *Chromatographia* **50**, 689-694 (1999)
- ⁴² Heintz, J.; Hernandez, M.; Gomez, F. A.: *J. Chromatogr. A* **46**, 261-268 (1999)
- ⁴³ Wang, A. J.; Vainikka, K.; Witos, J.; D'Ulivo, L. Clipa, G.; Kovanen, P. T.; Öörni, K.; Jauhiainen, M.; Riekkola, M. L.: *Anal. Biochem.* **399**, 93-101 (2010)

-
- ⁴⁴ Bello, M. S.; Rezzonico, R.; Righetti, P. G.: *Science* **299**, 773-776 (1994)
- ⁴⁵ Sharma, U.; Gleason, N. J.; Carbeck, J. D.: *Anal. Chem.* **77**, 806-813 (2005)
- ⁴⁶ Taylor G.: *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A* **225**, 473-477 (1954)
- ⁴⁷ Foret, F.; Křivánková, L.; Boček, P.: *Capillary Zone Electrophoresis*, VCH: Weinheim, Německo, 1992
- ⁴⁸ Erny, G. L.; Bergström, E. T.; Goodall, D M.: *J. Chromatogr. A* **959**, 229-239 (2002)
- ⁴⁹ Haarhoff, P. C.; Van der Linde, H. J.: *Anal. Chem.* **38**, 573-582 (1966)
- ⁵⁰ Hruška, V.; Riesová, M.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **33**, 923-930 (2012)